

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 29 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22580183

研究課題名（和文） 樹木細胞におけるリグニン前駆物質の分布

研究課題名（英文） Distribution of lignin precursors in tree cells.

研究代表者

吉永 新（YOSHINAGA ARATA）

京都大学・大学院農学研究科・助教

研究者番号：60273489

研究成果の概要（和文）：樹木分化中木部におけるリグニン前駆物質の分布をマトリックス支援レーザー脱離イオン化/飛行時間型/質量イメージング(MALDI/TOF/MS imaging)を用いて調べた。四酸化オスミウム蒸気による処理と組み合わせることにより、分子量が等しいスクロースとコニフェリンの分布を識別することに成功した。その結果、針葉樹分化中木部において二次壁形成中の仮道管にコニフェリンが存在することが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：Matrix-assisted laser desorption/ionization imaging mass spectrometry (MALDI-IMS) was applied to detect monolignol glucosides in differentiating xylems of several Japanese softwoods. MALDI-IMS combined with osmium tetroxide vapor treatment enabled us to distinguish distribution of sucrose and coniferin with the same molecular weight. MALDI-IMS using transverse sections of normal wood in Japanese cypress (*Chamaecyparis obtusa*) showed that coniferin was mainly distributed in tracheids during secondary wall formation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	2,300,000	690,000	2,990,000

研究分野：樹木細胞学

科研費の分科・細目：森林学・木質科学

キーワード：リグニン，前駆物質，コニフェリン，スクロース，木質化，細胞壁，MALDI-TOF MS，イメージング

## 1. 研究開始当初の背景

リグニンはコニフェリルアルコール及びシナピルアルコールといったモノリグノール類がペルオキシダーゼまたはラッカーゼによって脱水素重合することで形成される

と考えられている。リグニン前駆物質としてはコニフェリルアルコール及びシナピルアルコールであるという説と、最近ではその配糖体であるコニフェリン、シリンジンがβ-グルコシダーゼの働きで相当するアルコールに変換されるという説がある。近年の報告

ではβ-グルコシダーゼが分化中木部の細胞壁に存在することが示されている。一方、これまで、樹木分化中木部におけるリグニン沈着過程を観察するための顕微鏡観察においては、試料を固定や脱水の過程を経て樹脂に包埋するという操作が広く用いられてきた。この操作によって、水に可溶性成分や、有機溶媒に可溶性成分は除去されてしまっている。そのため、樹木分化中木部において、リグニン前駆物質がどのように分布しているかについては通常の試料作製法を用いる限りわからないのが現状である。これまで、形成層帯から連続的に接線断面切片を作製し、モノリグノール配糖体を定量した研究例はあるが、細胞別の分布については明らかになっていない。研究代表者は顕微ラマン分光法を用いてヒノキ分化中木部におけるコニフェリンの分布を明らかにした (Morikawa et al. *Holzforchung*, 64, 61-67 (2010))。その際、MALDI-TOF MS を用いて3種類の配糖体を識別できることを見いだした。そこで、分化中木部からリグニン前駆物質を保持したまま試料を調製し、その分布を明らかにすることができれば、木質化の機構に関して新たな知見が得られると考えた。

## 2. 研究の目的

マトリックス支援レーザー脱離イオン化 / 飛行時間型 / 質量イメージング (MALDI/TOF/MS imaging) は組織切片中における様々な物質の分布を高感度に検出できる方法であり、動物細胞及び植物細胞における物質の分布を調べるために広く用いられてきている。本研究では、リグニン前駆物質を保持したまま試料を調製し、MALDI/TOF/MS imaging を用いて、木部細胞の木質化過程におけるリグニン前駆物質の種類と、その細胞内及び細胞壁内分布を明らかにし、樹木細胞壁の木質化の機構について、従来の研究手法では得られない新しい知見を得ることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 切片の調製

京都大学フィールド科学教育研究センター北白川試験地に生育するスギ及びヒノキ直立木より、木部形成の活発な5月下旬から6月上旬にかけて伐木し、正常材分化中木部を含むブロックを採取した。また、一部の樹木を3月下旬に30-45°傾斜し、6月に伐木し、圧縮あて材を形成中の分化中木部を含むブロックを採取した。採取後直ちにスライディングマイクロトームを用いて厚さ20µmの横断面切片を作製した。切片はスライドガラスに分化中木部のぬれた部分がガラス表面に

できるだけ接触しないように載せ、室温で乾燥後、真空乾燥し、-30°Cに保存した。

### (2) ターゲットプレートへの固定

深さ120µmとなるように座ぐり加工を施したターゲットプレート (MTP target plate, Bruker Daltonics) 上に導電性C両面テープ (日新 EM、厚さ約110µm) をはり付け、その上に乾燥した切片を固定した。

DHB (2,5-dihydroxybenzoic acid) を50%アセトニトリル水溶液に溶解し、カチオン化剤としてトリフルオロ酢酸ナトリウム、切片の厚さによるずれを補正するための標準物質としてLeucine Enkephalin acetate salt hydrate (Mw: 555.6, Sigma) を添加し、エアブラシを用いてプレート上に噴霧し、真空乾燥した。

### (3) MALDI/TOF/MS イメージング

イメージング測定はBruker Daltonics社製MALDI-TOF-MS (autoflex III) 及びfleximaging ソフトウェアを用いて行った。レーザー照射間隔を50µmとした。m/z値のキャリブレーションにはPEG600から得られる複数のピークを用いた。

### (4) CID (Collision induced dissociation) 測定

MALDI/TOF/MSでは、同じ分子量を持った複数の物質が同一のm/z値のところにピークを生じる可能性がある。従って、イメージングで得られる分布が目的とする物質かどうかを確認する必要がある。ピークの同定のため、特定のピークを生じる物質にアルゴンガスと衝突させ、得られた断片から生じるフラグメントイオンのパターンを測定するCID測定を行った。

スクロース及び3種類のモノリグノール配糖体 (コニフェリン、シリンジン、p-グルコマリルアルコールの水溶液をDHBと混合し、プレート上に滴下したものについて同様に測定し、両者のCIDスペクトルを比較した。

### (5) 切片の四酸化オスミウム蒸気処理

分子量が等しく、CIDスペクトルも同じであるコニフェリンとスクロースを識別するため、切片に四酸化オスミウム蒸気処理を施した。乾燥した切片の一部を4%四酸化オスミウム水溶液とともにサンプル管に入れ、室温、24-48h、四酸化オスミウム蒸気によって処理した。処理後の切片は(2)、(3)と同様にプレートへの固定、マトリックスの噴霧を行い、イメージング測定に供した。

## 4. 研究成果

### (1) MALDI/TOF/MS イメージング

動物細胞を用いたイメージングでは導電性のコーティングを施した特殊なスライドガラスに凍結マイクロームを用いて作製した切片を載せ、融解によって固着させる方法が一般的である。しかしながら、分化中木部からの切片は切片作製後にカールしてしまい、融解によってスライドガラスに固着させることが困難であった。そこで、MALDI-TOF MS測定に通常用いられている金属製のターゲットプレートの中央部を深さ 120  $\mu\text{m}$  になるように座ぐり加工を施し、その上に厚さ約 110  $\mu\text{m}$  の導電性C両面テープをはり、その上に切片を固定することにより、切片中央部の高さが元々のターゲットプレートの高さと同じになるようになり、良好なイメージング測定が可能となった。マトリクスに分子量既知の物質を混合してピークの位置を調べたところ、切片の厚さむらによるピークのずれはほとんどないことがわかった。

正常材及び圧縮あて材分化中木部において、二次壁形成中と思われる部分にコニフェリン由来と思われるピーク ( $m/z$  365、 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ) が検出されたが、木化の完了した部位には検出されなかった。

#### (2) CID 測定

二次壁形成中に見られた物質がコニフェリンかどうかを確認するため、CID 測定を行い、フラグメントイオンのパターンを標品と比較した。その結果、パターンはコニフェリンとほぼ一致した。しかしながら、同様に分化中木部に存在することが報告されているスクロースは分子量がコニフェリンと同じであるので、その CID 測定におけるフラグメントイオンのパターンを比較した結果、そのパターンはコニフェリンとほぼ一致した。従って、MALDI/TOF/MS イメージングのみではコニフェリンの分布とスクロースの分布を区別できないことが明らかになった。

#### (3) 四酸化オスミウム蒸気処理

スクロースとコニフェリンの分子構造を比較し、コニフェリンの側鎖に存在する C7-C8間の C=C 二重結合に着目した。四酸化オスミウムは C=C 二重結合に2つの水酸基を導入することができる試薬として知られており、しかも蒸気による反応が可能である。従って、分化中木部の切片を四酸化オスミウム蒸気によって処理することにより、切片中の分布を変えずに、コニフェリンのみに水酸基を導入することで、スクロースの分布と識別できるのではないかと考えた。

カチオン化剤を添加したマトリクスと混合した3種類のモノリグノール配糖体の水溶液を MALDI/TOF/MS 分析すると、 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ( $p$ -グルコキマリルアルコール： $m/z$  335、コニフェリン： $m/z$  365、シリンジン： $m/z$  395)

のピークがそれぞれ検出された。これらの配糖体を滴下したポプラ切片を四酸化オスミウム蒸気で処理すると、ピークがそれぞれ  $m/z$  34 分だけシフトし、 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ( $p$ -グルコキマリルアルコール： $m/z$  369、コニフェリン： $m/z$  399、シリンジン： $m/z$  429)のピークが検出された。一方、スクロースを滴下した切片では  $m/z$  365 ( $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ) のピークのみが検出された。このことは四酸化オスミウム蒸気処理によってモノリグノール配糖体中の C7-C8間二重結合が酸化され、水酸基が2つ導入されたことを示している。従って、この方法を分化中木部の切片に適用することで、コニフェリンとスクロースの分布を識別できる可能性が示唆された。

#### (4) 正常材におけるコニフェリンの分布

スギ及びヒノキの正常材分化中木部の切片を四酸化オスミウム蒸気処理したところ、二次壁形成中と思われる部分に  $m/z$  399 ( $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ) が検出されたが、木化の完了した部位には検出されなかった。48h 処理を行っても、同様の部分に  $m/z$  365 ( $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ) が検出された。この  $m/z$  365 ( $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ) はスクロースもしくは未反応のコニフェリンの分布を示すと考えられる。ヒノキについては同じ試料で顕微ラマン分光法により、二次壁形成中の細胞内こうにコニフェリンが存在することが示されており (Morikawa et al. *Holzforchung*, 64, 61-67 (2010))、その部位とコニフェリン由来と思われるピーク  $m/z$  399 ( $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ) が検出された部位はほぼ一致していた。このことは、正常材仮道管の木化において、二次壁形成中にコニフェリンを細胞内に蓄える時期が存在し、その後二次壁の木化が活発に進行する時期には何らかのメカニズムで木化中の細胞壁へ送られることを示している。

#### (5) 圧縮あて材におけるコニフェリンの分布

スギ及びヒノキの圧縮あて材分化中木部の切片を四酸化オスミウム蒸気処理したところ、正常材と異なり、 $m/z$  399 ( $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ) のピークが正常材と比べてはるかに小さく、その分布を画像化することが困難であった。正常材と比べ、圧縮あて材では仮道管におけるリグニン量が増加することが知られている。従って、細胞壁に送られるモノリグノールの量は正常材よりも多いと考えられる。それにもかかわらず、コニフェリンの分布が確認できなかったのは、モノリグノール (又はその配糖体) の合成と同時に細胞壁への輸送が効率よく行われていることを示唆している。正常材では二次壁形成中の仮道管内こう (おそらく液胞中) にコニフェリンを一度プールし、その後二次壁の木化が活発に起こる時期に何らかのメカニズムで細胞壁に送っ

ていると考えられる。今回の結果は、正常材と圧縮あて材でモノリグノールの輸送の機構が異なることを示している。これらの成果はこれまでに国内外において報告例がなく、新しい知見と言える。

以上の結果より、四酸化オスミウム蒸気処理と組み合わせた MALDI/TOF/MS imaging は、樹木分化中木部におけるモノリグノール配糖体の分布を明らかにするためにきわめて有効な方法であることが示唆された。

今後は、樹皮における師部繊維の木化や、広葉樹正常材、引張あて材における木化等、様々な試料に応用していく予定である。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

(1) 吉永 新, 上高原 浩, 高部圭司, MALDI/TOF/MS imaging によるモノリグノール配糖体分布の可視化(2) OsO<sub>4</sub> 処理によるコニフェリンとスクロースの識別、第 63 回日本木材学会大会, 2013 年 03 月 27 日, 岩手大学

(2) 吉永 新, 上高原 浩, 高部圭司, Distribution of coniferin in differentiating softwood xylem using MALDI imaging mass spectrometry. Lignobiotech II Symposium, 2012 年 10 月 14 日~2012 年 10 月 17 日, アクロス福岡

(3) 吉永 新, 上高原 浩, 高部圭司 MALDI/TOF/MS imaging によるモノリグノール配糖体分布の可視化(1)針葉樹分化中木部におけるコニフェリンの分布, 第 62 回日本木材学会大会, 2012 年 3 月 16 日, 北海道大学

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

吉永 新 (YOSHINAGA ARATA)

京都大学・大学院農学研究科・助教

研究者番号: 60273489

### (2) 研究分担者

上高原 浩 (KAMITAKAHARA HIROSHI)

京都大学・大学院農学研究科・准教授

研究者番号: 10293911